

家蚕类泛素化翻译后修饰蛋白 NEDD8 的 cDNA 克隆、表达分析和亚细胞定位

于洁¹, 徐莉^{1,2}, 沈中元^{1,2}, 唐旭东^{1,2,*}

(1. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏镇江 212018; 2. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江 212018)

摘要:【目的】NEDD8 是一种重要的蛋白质翻译后修饰蛋白,对底物蛋白的功能具有重要的调节作用。本研究旨在探索家蚕 *Bombyx mori* 中 NEDD8 的功能。【方法】利用 RT-PCR 技术,从家蚕 BmN 细胞中克隆了家蚕 NEDD8 完整的开放阅读框。通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测家蚕 NEDD8 在不同发育阶段、5 龄第 3 天幼虫不同组织中以及 BmNPV 感染 BmN 细胞后的相对表达量。通过构建 GFP 融合表达的重组 BmNPV (*B. mori* nucleopolyherovirus) 感染家蚕 BmN 细胞,在共聚焦显微镜下观察 NEDD8 在细胞中分布情况,用 GFP 抗体进行 Western blot 验证。【结果】克隆获得了 NEDD8 基因。序列分析表明,家蚕 NEDD8 高度保守,与家蚕泛素蛋白氨基酸序列一致性最高。qRT-PCR 分析结果表明,NEDD8 在家蚕的不同组织中均有表达,其中头部中表达量最高,其次是丝腺中,而在精巢和卵巢中表达量最低;在家蚕 5 龄第 3 天幼虫始到化蛹后第 3 天 NEDD8 的表达量开始逐渐增加,化蛹后降至低水平;在家蚕杆状病毒感染 BmN 细胞的早期和极晚期 NEDD8 的表达量都有明显增加。GFP-NEDD8 融合表达定位显示 NEDD8 在 BmN 细胞内普遍存在,分布于整个细胞中,并且在感染 48 h 后存在细胞质内的聚集现象。【结论】NEDD8 编码序列在物种间高度保守;NEDD8 在家蚕幼虫头部中表达量最高,在化蛹阶段表达量逐渐增加;NEDD8 在 BmN 细胞内普遍存在并且可能与参与 BmNPV 复制。本研究所得结果为进一步研究 NEDD8 在家蚕中的生物学功能及修饰底物蛋白的作用机制奠定了基础。

关键词: 家蚕; 泛素化; 类泛素样蛋白; NEDD8; 表达分析; 细胞定位

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2016)09-0948-08

cDNA cloning, expression analysis and subcellular localization of ubiquitin-like post modification protein NEDD8 in the silkworm, *Bombyx mori*

YU Jie¹, XU Li^{1,2}, SHEN Zhong-Yuan^{1,2}, TANG Xu-Dong^{1,2,*} (1. School of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China; 2. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China)

Abstract: 【Aim】NEDD8 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8) is an important post-translational modification protein, and plays regulatory roles in the function of its substrate proteins. This study aims to explore the function of NEDD8 in the silkworm, *Bombyx mori*. 【Methods】RT-PCR technology was used to clone the full-length ORF of NEDD8 from BmN cells. The expression of NEDD8 was detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) in different developmental stages, different tissues of the 5th instar day-3 larvae, and BmNPV infected BmN cells of *B. mori*. eGFP-fused NEDD8 was expressed in BmN cells by Bac to Bac system and observed under confocal microscope. Western blotting with GFP antibody was performed to verify the expression of GFP-NEDD8 fusion protein in BmN cells. 【Results】NEDD8 was cloned. Sequence analysis showed that NEDD8 is highly conserved,

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20161365); 蚕桑产业技术体系专项“蚕病虫害防控” (No. CARS-22)

作者简介: 于洁, 女, 1990 年 5 月生, 江苏淮安人, 硕士研究生, 研究方向为分子微生物学, E-mail: 1161800814@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xudongt@aliyun.com

收稿日期 Received: 2016-06-20; 接受日期 Accepted: 2016-08-21

and has the highest amino acid sequence identity with silkworm ubiquitin. Real-time quantitative PCR analysis showed that *NEDD8* was differentially expressed in various tissues of silkworm with the highest expression level in the head, and then in silk gland, and the lowest expression level in testis and ovary. During the pupal stage, the expression level of *NEDD8* gradually increased from the 5th instar day-3 larvae to 3-day-old pupae, while significantly decreased in adults. When BmN cells were challenged with BmNPV, the expression level of *NEDD8* increased at the early and very late stages of BmNPV infection. GFP-NEDD8 fusion expression analysis showed that NEDD8 was distributed throughout the BmN cells. At 48 h post infection, aggregations of NEDD8 were formed in the cytoplasm of BmN cells. 【Conclusion】 The *NEDD8* sequence is highly conserved among different species. It has the highest expression level in the head of *B. mori* larva, and increases gradually during the pupal stage of the moth. NEDD8 is localized in the whole BmN cells and may be involved in BmNPV replication. The results lay the foundation for further study of the biological function of NEDD8 and the modification mechanism of its substrate proteins in *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*; ubiquitination; ubiquitin-like protein; NEDD8; expression analysis; cellular localization

蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)是细胞蛋白质发挥生物学功能的重要调节机制之一,其作为一种重要的可逆的翻译后水平调节机制,在机体受到外界刺激时对蛋白质功能起着精细的调节作用,有助于机体针对刺激产生快速有效的反应。泛素化(ubiquitination)是一种最常见的翻译后修饰,它是在蛋白质翻译后,通过将泛素分子结合到靶蛋白上,形成多聚泛素链,而带有多聚泛素链的靶蛋白被 26S 蛋白酶识别和降解(Swatek and Komander, 2016)。在过去的十几年中,一些类似于泛素化修饰的蛋白质翻译后修饰机制如 SUMO, NEDD8 和 ISG15 等被不断发现(Cajee *et al.*, 2012)。

NEDD8(neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8)是一种类泛素样蛋白(ubiquitin-like protein)。在所有类泛素样蛋白之中,小鼠中 NEDD8 的结构与泛素最为接近,有 80% 的一致性,发生机制也与泛素化相似,需要 E1, E2 和 E3 等酶介导的一系列酶促反应,并且是一个可逆的过程(Ferro *et al.*, 2007; Soucy *et al.*, 2010)。虽然如此,NEDD8 与泛素的生物学功能应该是不同的,NEDD8 不直接影响底物蛋白的稳定性,而是对底物蛋白的生物化学功能进行调控。有研究表明,NEDD8 对真核生物而言至关重要,NEDD8 的修饰系统的缺失将导致许多模式生物的胚胎死亡,包括小鼠、线虫、果蝇、和拟南芥等(Podust *et al.*, 2000; Tateishi *et al.*, 2001)。

NEDD8 与底物的共价结合称为 Neddylation,是一种新型的蛋白质翻译后修饰机制。Neddylation 修

饰对蛋白功能具有重要的调节作用,如改变蛋白质的空间构象、阻碍底物与其他蛋白质的相互作用和招募与 NEDD8 相互作用的蛋白等(Chairatvit and Ngamkitdechakul, 2007; Xirodimas *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 2011)。Neddylation 的一个重要生理功能是调节泛素连接酶 E3 活性,促进泛素化通路的进行。NEDD8 的主要作用底物为 cullin 蛋白家族,这种蛋白是泛素结合酶 E3 的主要核心结构之一,NEDD8 在一系列酶的催化下共价结合于 cullin 蛋白,形成 NEDD8 链状结构,使泛素结合酶 E3 的构象发生改变,促进负载有泛素的 E2 进入 E3 底物复合体,使底物发生泛素化。研究表明,Neddylation 将使待降解蛋白的泛素化效率大大提高,促进该蛋白被 26S 蛋白酶体的降解(Pan *et al.*, 2004; Sufan and Ohh, 2006)。

NEDD8 作为蛋白翻译后修饰的重要修饰蛋白,它的修饰机制在家蚕 *Bombyx mori* 中的作用目前还未见报道。因此,本研究以家蚕为实验对象,研究 NEDD8 在家蚕中的时空表达及细胞内定位情况,为进一步研究其生物学功能及作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

p50 品系家蚕幼虫在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 80% 条件下饲养至 5 龄起蚕。解剖 5 龄第 3 天幼虫获得头部、中肠、丝腺、皮肤、马氏管、血液、脂肪体、

卵巢、精巢组织;获得 5 龄第 3 天整个幼虫、化蛹后第 1, 3, 5, 7 和 9 天的全蛹,以及羽化后第 1 天的成虫(每样本随机取 10 头蚕);用高压灭菌的 0.1% DEPC(焦碳酸二乙酯)水清洗后置于液氮中迅速冷却后于 -80°C 超低温冰箱保存。家蚕 BmN 细胞系由中国农业科学院蚕业研究所家蚕生理与病理研究室培养与保存。家蚕杆状病毒野生型 T3 株病毒以 $\text{MOI} = 5$ 感染 6 孔板中的 BmN 细胞,感染后 3, 6, 12, 24, 48 和 72 h 后收集细胞。

1.2 RNA 提取和反转录

液氮研磨样品提取 RNA 按照北京博凌科为生物技术有限公司的 RNeasy 超纯总 RNA 快速提取试剂盒说明书进行。研钵经 150°C 高温烘烤 4~6 h。实验所用离心管无 RNase,移液器枪头用 0.1% DEPC 水浸泡后 121°C 高压灭菌 40 min。cDNA 反转录按照 TaKaRa 公司的反转录 PCR 试剂盒说明书进行。

1.3 NEDD8 基因的克隆与序列测定

引物用 Primer Premier 5.0 软件设计,NEDD8-F (5'-ATGTTGATTAAAGTCAAGA-3') 和 NEDD8-R (5'-TCATTCGCCTCCCTTAAA-3')。PCR 产物经 AXYGEN 凝胶回收试剂盒纯化回收后连接到 pMD-19T,转化大肠杆菌 TOP10,蓝白斑筛选挑取白色单菌落进行菌液 PCR 鉴定,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 定量 PCR

根据 NEDD8 全长序列设计一对特异引物 QRT-NEDD8-F (5'-GCATTCGCCCGCAGCAACAG-3') 和 QRT-NEDD8-R (5'-CGCCTCCCTTAAAGCCAAAAC-3')。以稳定表达的基因 *GAPDH* (GenBank 登录号: NM_001043921.1) 为内参,引物序列为 BmGAPDH-F (5'-TTCATGC CACAAGTCTACA-3') 和 BmGAPDH-R (5'-AGTCAG CTTGCCATTAAGAG-3')。在实时荧光定量 PCR 仪 (ABI7300) 上检测基因在家蚕不同组织、发育阶段及 BmNPV 感染 BmN 后的表达情况。实验按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书建立 20 μL 反应体系: ddH₂O 7.6 μL 、ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μL 、Primer F/R 各 0.5 μL 、2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 10 μL 、cDNA 模板 1 μL 。应用 ABI 7300 SDS software V2.0 (Applied Biosystems) 软件分析每个反应的值,计算相对表达量,并用 SPSS 16.0 分析表达差异。

1.5 序列分析

序列同源性分析采用 MEGA6 软件,图像编辑使用 Photoshop CS2 软件。

1.6 pFastBac1-EGFP-NEDD8 融合表达载体构建

设计引物,在 NEDD8 上游引入 *Bam*H I 酶切位点 (5'-GGATCCTTGATTAAAGTCAAGA-3'),下游引入 *Xho* I 酶切位点 (5'-CTCGAGTCATTCGCCTCCCTTAAA-3'),构建 pFastBac1-EGFP-NEDD8 重组质粒,转化 BmDH10Bac 感受态细胞,在含 IPTG 和 X-gal 及 Kan, Gen 和 Tet 的 LB 固体培养基平板筛选阳性重组质粒(白斑)。碱法抽提阳性重组病毒质粒,并用 M13F/M13R 通用引物进行 PCR 扩增鉴定。鉴定正确的质粒按照北京英格恩生物科技有限公司转染试剂 (Entranster[™]-H4000) 转染说明书,转染 BmN 细胞。转染细胞后在 OLYMPUS 倒置荧光显微镜 OLMPUS IX71 下观察绿色荧光的有无,获得重组杆状病毒 vBac-eGFP-NEDD8。

1.7 NEDD8 在 BmN 细胞中的定位

重组杆状病毒 vBac-eGFP-NEDD8 以 $\text{MOI} = 5$ 感染 BmN 细胞,感染 24 和 48 h 后在莱卡 Sp8 共聚焦显微镜下观察绿色荧光的位置,DAPI 染核。

BmN 细胞接种于共聚焦专用细胞培养皿中,4% 多聚甲醛固定 2 h,随后用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 透化 30 min,PBS 洗涤后加入 1:1 000 (v/v) 稀释的兔抗 NEDD8 (Sigma-Aldrich),室温孵育 1 h,洗涤后加入 1:5 000 (v/v) 稀释的 FITC 标记的羊抗兔二抗(碧云天),PBS 洗涤后在共聚焦显微镜下观察、拍照。

1.8 Western blot

收集经重组病毒 vBac-eGFP-NEDD8 和对照病毒 vBac-eGFP 感染 3 d 后的 BmN 细胞,PBS 缓冲液洗涤 3 次,SDS-PAGE 分离蛋白,转移至 PVDF 膜,3% BSA 封闭 2 h 后加入 GFP 单克隆一抗 (Santa Cruz), 4°C 过夜,洗膜后加入辣根酶标记的二抗 Goat anti-Mouse IgG HRP (北京博凌科为生物技术有限公司) 孵育,洗涤后与 ECL 增强型发光试剂反应,拍照。

1.9 数据统计与分析

采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 NEDD8 在家蚕 5 龄幼虫不同组织部位和不同发育阶段的相对表达量,分别将不同发育阶段或组织部位中的最低表达数值视为 1,作为对照样本,其他发育阶段或组织样品的表达量以相对于最低表达水平的倍数进行分析,结果以平均值表示,根据数据作柱形图。采用 SPSS 16.0 统计软件中单方差 (ANOVA) 分析的最小显著性差异 (LSD) 进行多重比较检验,显著性检验水平 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 NEDD8 扩增

家蚕 *NEDD8* 的 ORF 大小为 234 bp, 图 1 所示为家蚕 *NEDD8* PCR 扩增产物电泳结果, 与预期大小一致。克隆、测序后发现其核苷酸序列与 GenBank 数据库中标注为家蚕 *NEDD8* (Gene ID: 101744114) 的序列完全一致。

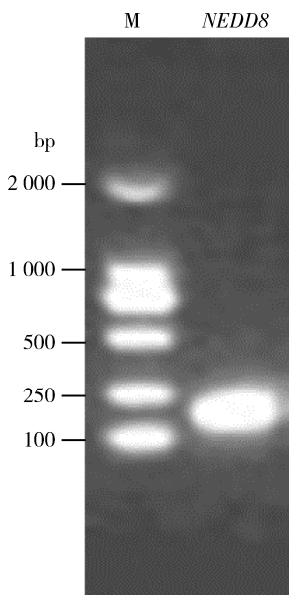


图 1 家蚕 *NEDD8* 的 PCR 扩增产物电泳结果
Fig. 1 The PCR amplification product of *NEDD8* from *Bombyx mori*
M: DL2000 DNA Marker; *NEDD8*: PCR 产物 PCR product.

2.2 NEDD8 序列分析

将家蚕 *NEDD8* 氨基酸序列与其他模式生物如人、小鼠、果蝇等的 *NEDD8* 序列进行多序列同源性比对分析, 结果显示 *NEDD8* 高度保守(图 2: A)。同时将家蚕 *NEDD8* 蛋白与家蚕泛素蛋白及家蚕其他泛素化类似蛋白 SUMO 和 ATG8 进行序列比对, 结果与其他模式生物类似, *NEDD8* 与泛素氨基酸序列一致性最高(图 2: B), 为 56%, 但比小鼠中 *NEDD8* 与泛素的氨基酸序列一致性(80%)低。

2.3 家蚕 NEDD8 在家蚕不同组织中的表达

采用 qRT-PCR 研究 *NEDD8* 在家蚕不同组织中的表达情况。结果显示(图 3), *NEDD8* 在家蚕幼虫不同组织中均有表达, 其中头部中表达量最高, 其次是丝腺中, 而在精巢和卵巢中表达量最低。

2.4 家蚕 NEDD8 在家蚕化蛹成蛾期的不同发育阶段的表达

NEDD8 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫始到化蛹后第 3 天 mRNA 表达量逐渐增加, 在化蛹后第 9 天时达到最高, 化蛾时降低(图 4)。

2.5 家蚕 NEDD8 在 BmNPV 感染后的表达

为了检测 *NEDD8* 是否与家蚕杆状病毒 BmNPV 的复制有关, 本研究在 mRNA 水平上检测了 *NEDD8* 的转录情况, 用野生型 BmNPV T3 株病毒感染家蚕 BmN 细胞, 感染后不同时间点取样, qRT-PCR 检测, *NEDD8* 在 BmNPV 感染后转录情况变化如图 5 所示, *NEDD8* 的表达量在 BmNPV 感染的早期和极晚期都有显著增加。

2.6 家蚕 NEDD8 在 BmN 细胞内的定位

本研究构建了融合表达 eGFP-*NEDD8* 的重组杆状病毒 vBac-eGFP-*NEDD8*, 通过转染 BmN 细胞的表达间接观察了 *NEDD8* 在细胞内的位置, 如图 6 所示, *NEDD8* 在细胞内普遍存在, 分布于整个细胞中, 同时随着病毒感染时间的增加(感染 48 h 后), 有些 *NEDD8* 蛋白质在细胞质中聚集, 形成了一些点状结构。随后用 *NEDD8* 抗体作了直接免疫荧光定位, 结果与间接法类似, 在整个细胞中都检测到了荧光信号。之后收集细胞, 用 GFP 单抗进行 Western blot 检测, 结果显示, 在 BmN 细胞中检测到融合蛋白 eGFP-*NEDD8* 的表达(图 7)。

3 讨论

NEDD8 在许多生物学过程中是一种重要的调控因子, 然而 *NEDD8* 修饰的底物以及泛素与 *NEDD8* 途径的关系仍未知。泛素连接酶中的 cullin 是 *NEDD8* 修饰的主要底物, 不同物种 cullin 蛋白的数目和种类都不一样, 比如人类编码 6 种 cullin 蛋白(cullin 1, 2, 3, 4A, 4B, 5 和 7) (Petroski and Deshaies, 2005), 通过分析家蚕基因组数据我们发现家蚕编码 7 种 cullin 蛋白(culin 1, 2, 3, 3A, 4A 和 4B, 以及 cullin 5), 但它们是否都参与泛素连接酶活性的调控及是否被 *NEDD8* 修饰还需要进一步的验证。目前, 不同物种的 *NEDD8* 分别在 HEK293 细胞、果蝇以及小鼠胚胎干细胞中研究其功能。从不同角度探究了 *NEDD8* 以及抑制剂 MLN4924 在抗肿瘤、诱导细胞自噬与凋亡、DNA 损伤修复等方面的作用 (Zhao *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2015; Nawrocki *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016)。

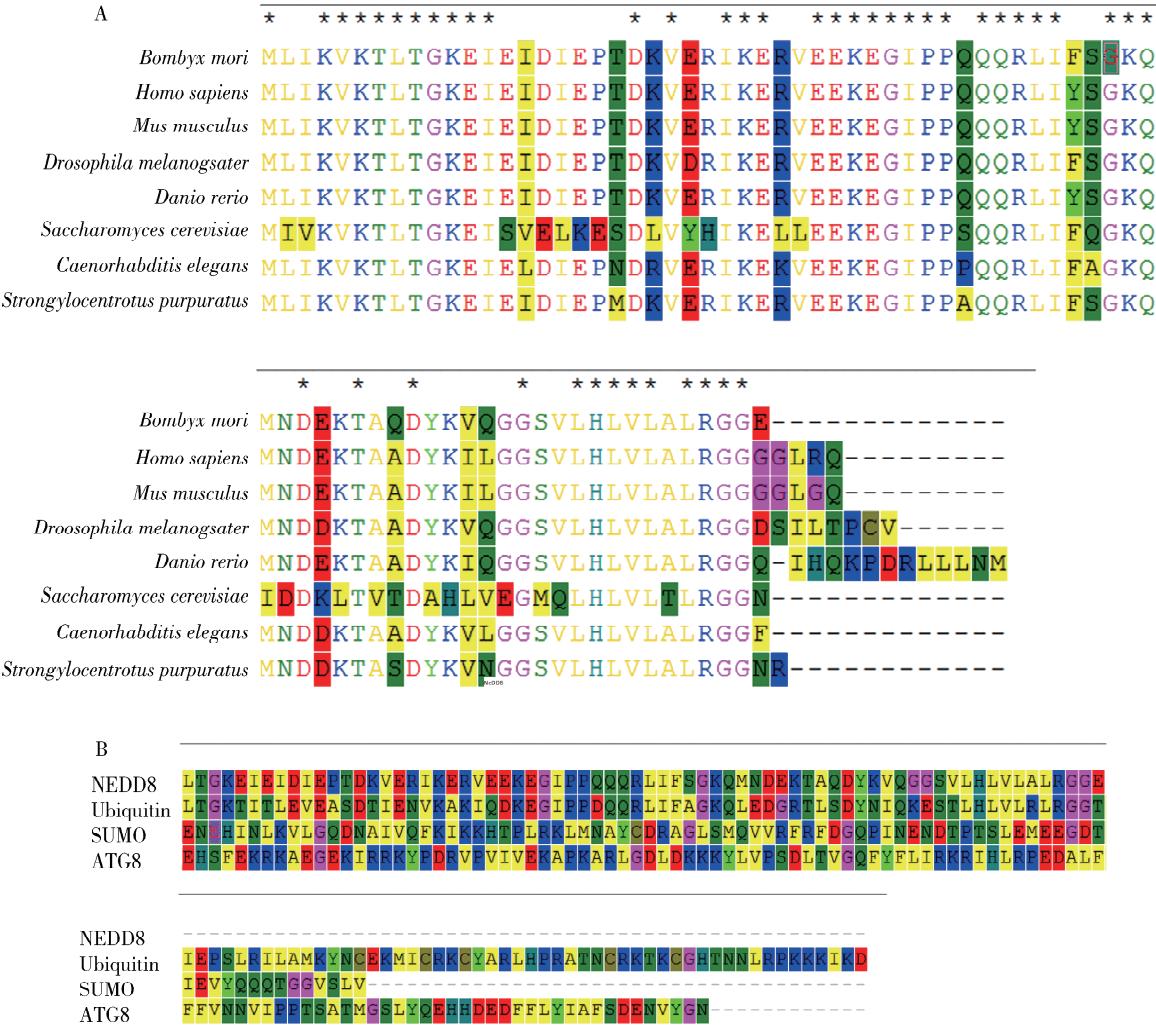


图2 家蚕及其他物种 NEDD8 蛋白的序列比对

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of NEDD8 proteins from *Bombyx mori* and other species

A: 家蚕及其他物种 NEDD8 蛋白的序列比对 Alignment of NEDD8 proteins from *Bombyx mori* and other species. NEDD8 来源种及其 GenBank 登录号: 家蚕 *Bombyx mori* (XP 004923973.1); 人 *Homo sapiens* (NP 006147.1); 小家鼠 *Mus musculus* (NP 032709.1); 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP 609919.1); 斑马鱼 *Danio rerio* (NP 958478.2); 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (NP 010423.4); 秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (NP 491727.1); 海胆 *Strongylocentrotus purpuratus* (XP 785172.1). B: 家蚕 NEDD8 与家蚕泛素和泛素类似蛋白的序列比对 Alignment of NEDD8 with ubiquitin and ubiquitin-like proteins of *B. mori*.

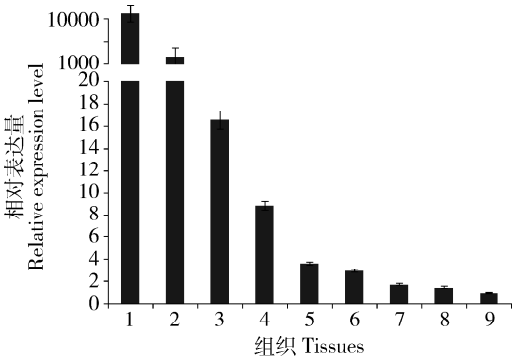


图3 *NEDD8* 基因在家蚕 5 龄第 3 天幼虫各个组织中的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *NEDD8* in various tissues of the 5th instar day-3 larvae of *Bombyx mori*

1: 头 Head; 2: 丝腺 Silk gland; 3: 表皮 Epidermis; 4: 马氏管 Malpighian tubes; 5: 中肠 Midgut; 6: 血液 Blood; 7: 脂肪体 Fat body; 8: 卵巢 Ovary; 9: 精巢 Testis. 图中数据为平均值 $\pm$ 标准误。Data in the figure are mean $\pm$ SE. 图 4 和 5 同 The same for Figs. 4 and 5.

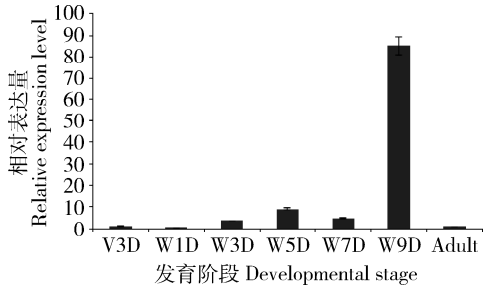


图4 *NEDD8* 在家蚕不同发育阶段的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *NEDD8* in different developmental stages of *Bombyx mori*

V3D: 5 龄第 3 天幼虫 The 5th instar day-3 larva; W1D: 化蛹后第 1 天 The 1st day after pupation; W3D: 化蛹后第 3 天 The 3rd day after pupation; W5D: 化蛹后第 5 天 The 5th day after pupation; W7D: 化蛹后第 7 天 The 7th day after pupation; W9D: 化蛹后第 9 天 The 9th day after pupation; Adult: 成虫 Adult.

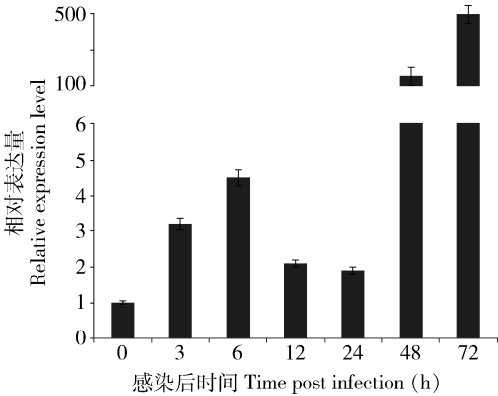


图5 家蚕 BmN 细胞感染 BmNPV 后 *NEDD8* 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of *NEDD8* after BmNPV challenge in BmN cells of *Bombyx mori*

本研究发现,家蚕 *NEDD8* 在家蚕幼虫头部、丝腺及表皮中表达量高,而在精巢和卵巢中的表达量比较低,这可能与 *NEDD8* 参与的特殊蛋白翻译后修饰机制有关。研究表明,*NEDD8* 间接地参与了细胞凋亡过程,如 Aoki 等(2012)发现,*NEDD8* 通过与转录因子 E2F1 的共价结合调节 E2F1 的活性,从而调控 E2F1 诱导的细胞凋亡。肿瘤细胞中,MLN4924 可以抑制 *NEDD8* 修饰途径,调控泛素化途径,最终引起肿瘤细胞的细胞凋亡(Watson *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2016)。钟仰进等(2005)发现,家蚕在蛹变态期,幼虫体内的丝腺组织迅速退化消亡即发生细胞凋亡,而 *NEDD8* 在家蚕蛹变态期表达量增加并且在丝腺中含量较高,我们推测 *NEDD8* 可能参与调控家蚕蛹变态期的细胞凋亡。

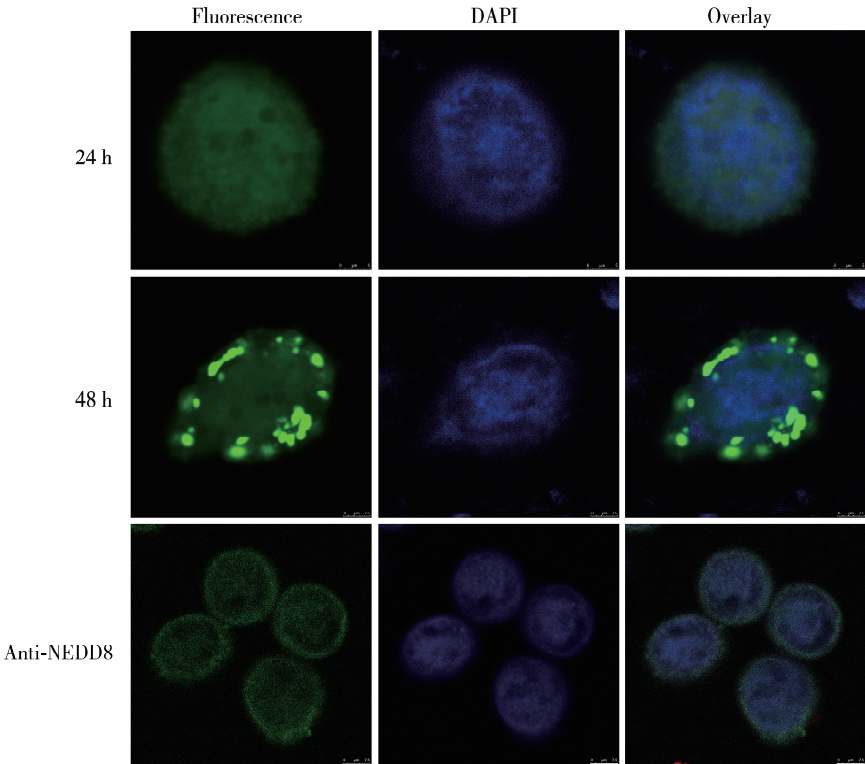


图6 家蚕 *NEDD8* 在 BmN 细胞内定位

Fig. 6 Localization of *NEDD8* in BmN cells of *Bombyx mori*

Fluorescence; GFP-*NEDD8* 蛋白的荧光图和 *NEDD8* 抗体定位荧光图 GFP-*NEDD8* protein photo under fluorescence and localization photo with *NEDD8* antibody; DAPI: 细胞核指示剂荧光图 Fluorescent photo with nuclear stain; Overlay: 荧光和细胞核指示剂合并图 Merged pictures of fluorescence and DAPI. 24 h, 48 h: 感染后时间 Time post infection; Anti-*NEDD8*: *NEDD8* 抗体 *NEDD8* antibody.

在 BmNPV 感染的家蚕 BmN 细胞中,*NEDD8* 表达量在病毒感染早期和极晚期增高,表明 *NEDD8* 可能参与了 BmNPV 感染家蚕的免疫调控。在家蚕细胞中,日本学者 Imai 等(2005)研究发现,BmNPV IE2 蛋白的核聚焦受其寡聚核结构域和泛素连接酶活性的调控,同时发现 BmNPV 的 IAP2, IE2 和 Pe38

蛋白具有泛素连接酶活性,而对泛素连接酶活性的抑制会导致 BmNPV 增殖的抑制 (Imai *et al.*, 2003),因此,*NEDD8* 可能通过调节 BmNPV 蛋白的泛素连接酶活性来调控 BmNPV 的复制。有研究发现,Neddylaton 通路特异性抑制剂 MLN4924 能够抑制猴免疫缺陷病毒、HIV 疱疹病毒、巨细胞病毒、腺

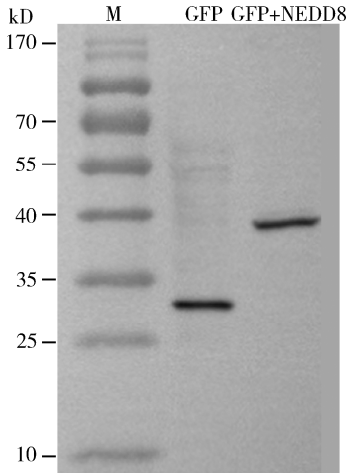


图 7 感染重组杆状病毒的 BmN 细胞中融合蛋白与 GFP 蛋白的 Western blot 分析

Fig. 7 Western blot analysis of GFP-NEDD8 fusion protein and GFP in BmN cells of *Bombyx mori* infected with recombinant bacmid baculoviruses

M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; GFP + NEDD8: BmN 细胞中的融合表达 Fusion expression in BmN cells; GFP: 阳性对照 Positive control.

病毒和流感病毒等的复制(Tokarev *et al.*, 2015; Le-Trilling *et al.*, 2016),我们也发现 MLN4924 同样能抑制 BmNPV 的复制(未发表数据),其具体作用机制还在进一步研究中。

关于 NEDD8 在家蚕细胞内的定位,我们发现用 NEDD8 抗体作直接免疫荧光定位显示 NEDD8 在整个细胞内都有分布,而 GFP 融合表达间接定位表明 NEDD8 在病毒感染早期广泛分布于细胞内,而在感染 48 h 后,NEDD8 存在一个聚集现象。在前期的研究中我们发现,BmNPV 对细胞的感染会引起细胞内聚集体的产生(Guo *et al.*, 2015),NEDD8 是否参与了聚集体的产生还需要进一步的研究。

参考文献 (References)

Aoki I, Higuchi M, Gotoh Y, 2012. NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction. *Oncogene*, 32(34): 3954–3964.

Cajee UF, Hull R, Ntwasa M, 2012. Modification by ubiquitin-like proteins: significance in apoptosis and autophagy pathways. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(9): 11804–11831.

Chairatvit K, Ngamkitidechakul C, 2007. Control of cell proliferation via elevated NEDD8 conjugation in oral squamous cell carcinoma. *Mol. Cell Biochem.*, 306(1–2): 163–169.

Ferro A, Carvalho AL, Teixeira-Castro A, Almeida C, Tome RJ, Cortes L, Rodrigues AJ, Logarinho E, Sequeiros J, Macedo-Ribeiro S, Maciel P, 2007. NEDD8: a new ataxin-3 interactor. *Biochim.*

Biophys. Acta, 1773(11): 1619–1627.

Guo ZJ, Tao LX, Dong XY, Yu MH, Tian T, Tang XD, 2015. Characterization of aggregate/aggresome structures formed by polyhedrin of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Sci. Rep.*, 5: 14601.

Han K, Wang QY, Cao HL, Qiu GH, Cao JX, Li X, Wang J, Shen BF, Zhang JY, 2016. The NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induces G2 arrest and apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*, 7(17): 23812–23824.

Imai N, Matsuda N, Tanaka K, Nakano A, Matsumoto S, Kang W, 2003. Ubiquitin ligase activities of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus RING finger proteins. *J. Virol.*, 77(2): 923–930.

Imai N, Matsumoto S, Kang W, 2005. Formation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus IE2 nuclear foci is regulated by the functional domains for oligomerization and ubiquitin ligase activity. *J. Gen. Virol.*, 86(3): 637–644.

Le-Trilling VTK, Megger DA, Katschinski B, Landsberg CD, Rückborn MU, Tao S, Krawczyk A, Bayer W, Drexler I, Tenbusch M, Sitek B, Trilling M, 2016. Broad and potent antiviral activity of the NAE inhibitor MLN4924. *Sci. Rep.*, 6: 19977.

Lin WC, Kuo KL, Shi CS, Wu JT, Hsieh JT, Chang HC, Liao SM, Chou CT, Chiang CK, Chiu WS, Chiu TY, Pu YS, Ho IL, Wang ZH, Chang SC, Liu SH, Jeng YM, Huang KH, 2015. MLN4924, a novel NEDD8-activating enzyme inhibitor, exhibits antitumor activity and enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human cervical carcinoma: *in vitro* and *in vivo* study. *Am. J. Cancer Res.*, 5(11): 3350–3362.

Nawrocki ST, Kelly KR, Smith PG, Keaton M, Carraway H, Sekeres MA, Maciejewski JP, Carew JS, 2015. The NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 disrupts nucleotide metabolism and augments the efficacy of cytarabine. *Clin. Cancer Res.*, 21(2): 439–447.

Pan ZQ, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K, 2004. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene*, 23(11): 1985–1997.

Petroski MD, Deshaies RJ, 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(1): 9–20.

Podust VN, Brownell JE, Gladysheva TB, Luo RS, Wang C, Coggins MB, Pierce JW, Lightcap ES, Chau V, 2000. A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27^{Kip1} by ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(9): 4579–4584.

Soucy TA, Dick LR, Smith PG, Milhollen MA, Brownell JE, 2010. The NEDD8 conjugation pathway and its relevance in cancer biology and therapy. *Genes Cancer*, 1(7): 708–716.

Sufan RI, Ohh M, 2006. Role of the NEDD8 modification of Cul2 in the sequential activation of ECV complex. *Neoplasia*, 8(11): 956–963.

Swatek KN, Komander D, 2016. Ubiquitin modifications. *Cell Res.*, 26(4): 399–422.

Tateishi K, Omata M, Tanaka K, Chiba T, 2001. The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J. Cell Biol.*, 155(4): 571–579.

Tokarev A, Stoneham C, Lewinski MK, Mukim A, Deshmukh S,

Vollbrecht T, Spina CA, Guatelli J, 2015. Pharmacologic inhibition of Nedd8 activation enzyme exposes CD4-induced epitopes within Env on cells expressing HIV-1. *J. Virol.*, 90(5): 2486 – 2502.

Watson IR, Irwin MS, Ohh M, 2011. NEDD8 pathways in cancer, Sine Quibus Non. *Cancer Cell*, 19(2): 168 – 176.

Xirodimas DP, Sundqvist A, Nakamura A, Shen L, Botting C, Hay RT, 2008. Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO Rep.*, 9(3): 280 – 286.

Zhao LQ, Yue P, Lonial S, Khuri FR, Sun SY, 2011. The NEDD8-activating enzyme inhibitor, MLN4924, cooperates with TRAIL to

augment apoptosis through facilitating c-FLIP degradation in head and neck cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 10(12): 2415 – 2425.

Zhong YJ, Zeng L, Huang ZJ, Liu JP, Deng XJ, Yang WY, Cao Y, Gu SH, 2005. Characteristics of degeneration and apoptosis of silk gland during the larval-pupal metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 48(3): 319 – 324. [钟仰进, 曾林, 黄志君, 刘吉平, 邓小娟, 杨婉莹, 曹阳, 顾世红, 2005. 家蚕蛹变态期丝腺组织的退化与细胞凋亡特征. 昆虫学报, 48(3): 319 – 324]

(责任编辑: 袁德成)